

Desarrollo de una nueva técnica de base colorimétrica para una rápida evaluación de la biodegradabilidad de materiales poliméricos

M. L. Burdisso^{1,2}, L. M. Salvatierra^{3,4}, L. M. Pérez^{1,2,3}

Proyecto “Caracterización experimental y teórica de Biopolímeros y Polímeros de interés tecnológico”

¹ Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas, Universidad Nacional de Rosario (UNR), Suipacha 531 (2000) Rosario, Argentina

² Instituto de Química Rosario (IQUIR, UNR-CONICET), Suipacha 570 (2000) Rosario, Argentina

³ Facultad de Química e Ingeniería, Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA), Av. Pellegrini 3314 (2000) Rosario, Argentina

⁴ Instituto de Físicoquímica Teórica y Aplicada (INIFTA, UNLP-CONICET), Diag. 113 y 64, 1900, La Plata, Argentina

burdissoluli@gmail.com; lucas_salvatierra@uca.edu.ar; leonardoperez@uca.edu.ar

Resumen. La necesidad de reducir el impacto ambiental causado por el uso de plásticos sintéticos obtenidos a partir de fuentes no-renovables ha motivado el desarrollo de nuevos materiales con carácter biodegradable. Sin embargo, los protocolos internacionales comúnmente utilizados para evaluar la biodegradabilidad de un material son laboriosos y suelen demandar elevados tiempos de procesamiento. En este trabajo, se presentan resultados preliminares obtenidos durante la etapa de desarrollo y puesta a punto de un método rápido, sencillo y eficiente para evaluar el potencial biodegradable de un material plástico, formulado a base de proteínas del lactosuero, utilizando un ensayo colorimétrico indirecto basado en la reducción enzimática de sales de tetrazolio durante el metabolismo aeróbico bacteriano.

Palabras clave. biodegradación de polímeros, método de screening, sales de tetrazolio

Abstract. In the last decades, the need to reduce environmental impact caused by petroleum-based plastics has motivated the development of new bio-based materials with biodegradable properties. However, international standard methods frequently used to assess the biodegradability of plastics require a complicated experimental setup, are time-consuming, and demand months of laborious work. In this article, we show preliminary results of a new, rapid, simple, and efficient method to assess the biodegradability of polymer plastics by using a colorimetric assay based on the enzymatic reduction of tetrazolium salts by the bacterial aerobic metabolism.

Keywords. plastic biodegradability assessment, colorimetric screening method, tetrazolium salts

INTRODUCCIÓN

Una de las características más destacadas de los materiales plásticos es la gran facilidad y economía con la que pueden ser procesados a partir de materias primas convenientemente preparadas. Sin embargo, en su gran mayoría, estas materias primas son derivados de recursos no-renovables provenientes del petróleo. La necesidad de reducir el impacto ambiental causado por el uso de plásticos sintéticos ha motivado el desarrollo de nuevos materiales más sustentables y de carácter biodegradable (Bourtoom, 2008; Javanmard, 2009). Sin embargo, los protocolos internacionales comúnmente utilizados para evaluar la biodegradabilidad de un material son laboriosos y suelen demandar tiempos de procesamiento excesivos (ASTM D 5338, ASTM D 6400). Por lo tanto, es deseable desarrollar nuevas metodologías que permitan detectar rápidamente el potencial biodegradable de un material plástico con el fin de poder tomar decisiones sobre la pertinencia o no de avanzar con los estudios estandarizados.

Ha sido reportado que la reducción de sales de tetrazolio, como el TTC (cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio), durante el metabolismo bacteriano activo puede ser utilizado como una herramienta analítica para cuantificar la viabilidad celular mediante métodos colorimétricos (Berridge *et al.*, 2005). Este indicador redox es reducido por las deshidrogenasas

bacterianas a 1, 3, 5-trifenilformazán de color rojo durante el metabolismo aeróbico como resultado del transporte de electrones; por lo tanto, la cantidad de formazán generado es proporcional a la biomasa bacteriana. Estas técnicas se han utilizado eficientemente para estimar la viabilidad celular y la proliferación de células en suspensión y de comunidades bacterianas en *biofilms* (Hatzinger *et al.*, 2003; Cerca *et al.*, 2005; Peeters *et al.*, 2008; Pérez *et al.*, 2010), sin embargo, en nuestro conocimiento, su aplicación para el estudio de la capacidad biodegradable de matrices poliméricas aún no ha sido indagado.

En el presente trabajo, se presentan resultados preliminares obtenidos durante la evaluación de la biodegradabilidad de un material bioplástico desarrollado a base de proteínas del lactosuero empleando un método colorimétrico desarrollado por los autores basado en la reducción bacteriana del TTC.

METODOLOGÍA

Materiales

El concentrado de proteínas del lactosuero (WPC 80%) empleado para la elaboración de las matrices bioplásticas fue gentilmente cedido por la empresa Arla Food Ingredients S.A. (Buenos Aires, Argentina). El indicador redox, cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio (TTC), fue provisto por Merck (Darmstadt, Alemania). Todos los demás reactivos utilizados en este estudio fueron de grado analítico.

Microorganismos

Para llevar adelante los estudios de biodegradación se emplearon las cepas *Escherichia coli* DH5 α , *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella typhimurium* ATCC 14028, y *Pseudomonas aeruginosa* PAO-1. Estos microorganismos fueron cedidos por el Área Bacteriología Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario, Argentina). Todas las cepas se conservaron a -70 °C en caldo Tripteína Soya (TSB, pH 7,2) conteniendo glicerol (Cicarelli, Santa Fe, Argentina) al 10% (v/v) como agente crio-protector, y fueron sub-cultivadas durante 16-18 h en caldo TSB (pH 7,2) a 37 °C en un *shaker* con agitación, previamente a su uso.

Preparación de láminas bioplásticas

El material bioplástico a ensayar se preparó a partir de WPC 80% como componente mayoritario y glicerol (Gli) como plastificante siguiendo una modificación de la técnica descrita por Soazo *et al.* (2013). Se disolvieron en 100 mL de agua destilada 10 g de WPC y 5 g de Gli (proporción WPC/Gli 2:1, concentración final de sólidos totales 15% p/v). Luego de agitar la suspensión durante 15 min, se calentó a 90 °C durante 30 min en un baño termostatzado (TSD-40, Tecno Dalvo, Buenos Aires, Argentina). A continuación, la suspensión se homogeneizó a 20.000 rpm durante 5 min empleando un equipo Omni GLH (Omni International Inc., Warrenton, Estados Unidos). Posteriormente, se colocó en un baño de hielo para detener la desnaturalización proteica y se enfrió hasta temperatura ambiente. Finalmente, se sonicó durante 1 h con el objetivo de promover su desgasificación. El pH final de la suspensión filmogénica resultante fue de 6,4-6,5.

Para la obtención de las láminas (*films*), se pesaron 10 g de suspensión en placas de Petri plásticas de 90 mm de diámetro. Las placas se secaron sobre una superficie nivelada en una cámara ambiental (SCT-Pharma S.A., Buenos Aires, Argentina) bajo condiciones controladas de temperatura (25 °C) y humedad relativa (58%). Se efectuó un examen visual periódico de las mismas, y las películas fueron despegadas cuando se observaron signos indicativos de la finalización del proceso de secado. Una vez despegadas de su soporte sólido, se estabilizaron durante 24 h en iguales condiciones a las de secado (25 °C, 58% humedad relativa).

Ensayo de biodegradación

La degradación microbiana del material bioplástico se estudió durante 20 días a 25 °C (agitación 150 rpm). En cada reactor se adicionaron 10 mL de solución salina, 0,5 mg/mL de TTC (cloruro de 2, 3, 5-trifenil tetrazolio) y 105 \pm 5 mg de muestra del material bioplástico (como única fuente de carbono). Posteriormente, cada reactor se inoculó con 100 μ L de una suspensión bacteriana crecida con agitación durante 16-18 h en caldo TSB (pH 7,2) a 37 °C (concentración de inóculo aprox. 2,5 \times 10⁷ UFC/mL). Como control positivo del ensayo se utilizó Glucosa al 10% v/v. El TTC es un compuesto incoloro que al entrar en contacto con los microorganismos metabólicamente activos es reducido por las enzimas deshidrogenasas a 1, 3, 5-trifenilformazán de color rojo, cuya absorbancia máxima se encuentra a 476 nm (Berridge *et al.*, 2005). Para determinar la acumulación intracelular del colorante, se tomó 1 mL de muestra de cada reactor a diferentes tiempos de incubación (24 h, 5, 10, 15 ó 20 días).

Las muestras se centrifugaron a 3000g durante 5 min para decantar los microorganismos viables. Luego de eliminar el sobrenadante, se procedió a efectuar la lisis de las células bacterianas con 1 mL de etanol (grado farmacéutico), seguido de un etapa de sonicación durante 10 min. Finalmente, se realizó una segunda centrifugación (5 min., 5000g) con el

objetivo de decantar los restos celulares, y se midió la absorbancia del sobrenadante a 476 nm empleando un espectrofotómetro Jasco V-530 (Jasco International, Japón). De esta manera, la cuantificación colorimétrica del grado de acumulación intracelular del colorante es proporcional a la cantidad de crecimiento bacteriano, el cual dependerá de la capacidad de los microorganismos para metabolizar el bioplástico. Como control negativo del ensayo se muestrearon reactores sin la adición de fuentes de carbono o con la adición de un plástico no-biodegradable (Parafilm®). Los resultados se informan como el promedio de al menos dos determinaciones.

RESULTADOS

En la Figura 1 se muestra una fotografía representativa del material bioplástico obtenido y utilizado en el presente estudio formulado a base de proteínas del lactosuero y glicerol. Como puede apreciarse, estas láminas presentan una coloración ligeramente amarillenta debido a la presencia de lactosa, grasas y fosfolípidos en la composición del WPC (Lorenzen y Schrader, 2006; Ramos *et al.*, 2013). Es de esperar que este material sea biodegradable debido a la elevada concentración en nutrientes de su formulación.



Figura 1. Láminas bioplásticas obtenidas a partir de concentrado de proteínas del lactosuero (WPC) y glicerol.

En la Figura 2 se observa un control negativo (sin adición de fuente de carbono) y un control positivo (con adición de Glucosa 1%) obtenidos durante las etapas preliminares de desarrollo y puesta a punto de la metodología propuesta en este estudio para evaluar la viabilidad celular empleando el indicador redox TTC. Como puede apreciarse, la coloración rojiza característica del formazán sólo se evidencia cuando en el medio de reacción se adiciona alguna fuente de nutrientes que pueda ser metabolizada por los microorganismos permitiendo su desarrollo aeróbico.

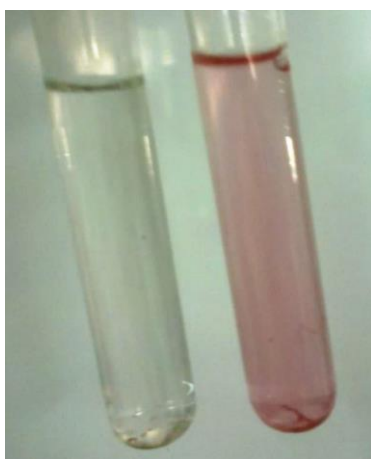


Figura 2. Control negativo (izquierda) y control positivo (derecha) típicos obtenidos en ensayos de determinación de viabilidad celular empleando TTC. Nótese a la derecha la coloración rojiza característica del formazán generada por reducción enzimática del TTC cuando las bacterias crecen en un medio conteniendo Glucosa como fuente de carbono.

En las Figuras 3-6 se muestran diferentes resultados obtenidos durante la evaluación del potencial biodegradable de materiales plásticos enfrentados a distintos microorganismos utilizando el ensayo colorimétrico basado en la reducción de TTC.

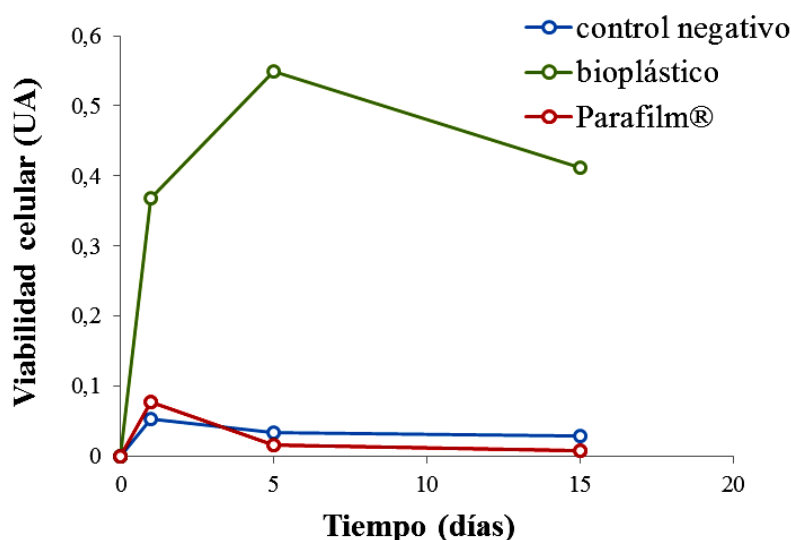


Figura 3. Ensayo de biodegradabilidad de plásticos utilizando la cepa *E. coli* DH5α.

En la Figura 3 se puede evidenciar el claro aumento de la biomasa bacteriana en presencia del bioplástico formulado a base de proteínas del lactosuero. Contrariamente, la adición de un plástico no-biodegradable, como el Parafilm®, imposibilita el crecimiento celular ya que es incapaz de ser utilizado como fuente de nutrientes por las bacterias aeróbicas presentes en el medio de reacción. Como consecuencia, las deshidrogenasas bacterianas se encuentran inactivas reprimiendo la conversión del TTC a formazán.

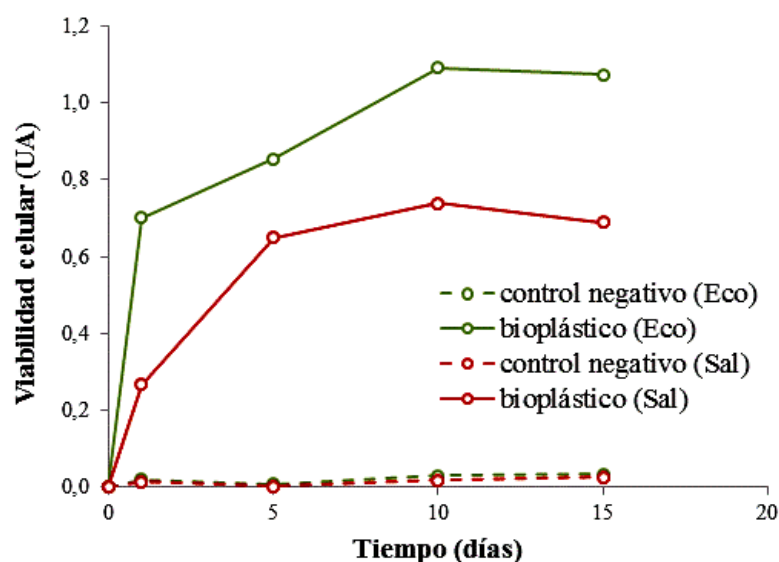


Figura 4. Ensayo de biodegradabilidad de láminas de WPC/Gli utilizando las cepas *E. coli* ATCC25922 (Eco) y *S. typhimurium* ATCC 14028 (Sal).

Es notable destacar que con esta metodología, es posible acceder a un resultado sobre el potencial biodegradable de un material plástico en las primeras 24 h de ensayo. La Figura 4 muestra los resultados obtenidos en estudios similares empleando dos enterobacterias. Nuevamente, la biodegradabilidad de la matriz plástica se manifiesta con el grado de acumulación intracelular del colorante, el cuál es proporcional al incremento de la biomasa bacteriana. Además, es interesante notar que tanto *E. coli* como *S. typhimurium* presentaron un comportamiento similar al utilizar láminas de WPC/Gli como sustrato.

Contrariamente, *S. aureus* presentó un período de latencia, luego del cual se hizo evidente su desarrollo, tanto en presencia de Glucosa como del bioplástico. En este caso, la asimilación de Glucosa como fuente de carbono mostró ser más eficiente (Figura 5) permitiendo un mayor desarrollo de las bacterias en solución.

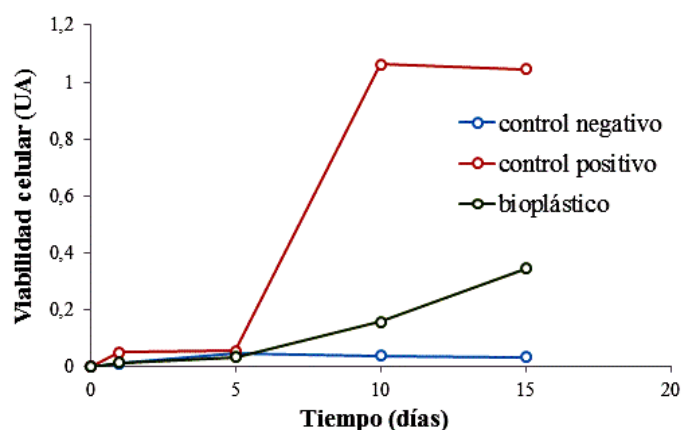


Figura 5. Ensayo de biodegradabilidad de láminas de WPC/Gli utilizando la cepa *S. aureus* ATCC25923.

Los resultados anteriores indican la importancia en la selección de los microorganismos indicadores de biodegradación, ya que cada bacteria posee distintas preferencias nutricionales y puede presentar diferencias metabólicas significativas. Por lo tanto, es interesante la evaluación del microorganismo con el fin de encontrar aquel más adecuado para evidenciar el potencial carácter biodegradable de un material o, a la inversa, utilizar esta metodología para realizar un *screening* en la búsqueda de microorganismos que puedan ser eficientes para degradar un material plástico en particular. Por ejemplo, los resultados mostrados en la Figura 6 sugieren que *Pseudomona aeruginosa* podría ser una bacteria muy eficiente para llevar adelante procesos degradativos de materiales plásticos constituidos a base de polímeros naturales. Los valores de absorbancia relativa alcanzados al emplear *films* de WPC/Gli como fuente de nutrientes superan en un orden de magnitud a los obtenidos para los otros microorganismos ensayados, en iguales condiciones, e incluso con los propios valores de viabilidad alcanzados al utilizar Glucosa como fuente de carbono (control positivo).

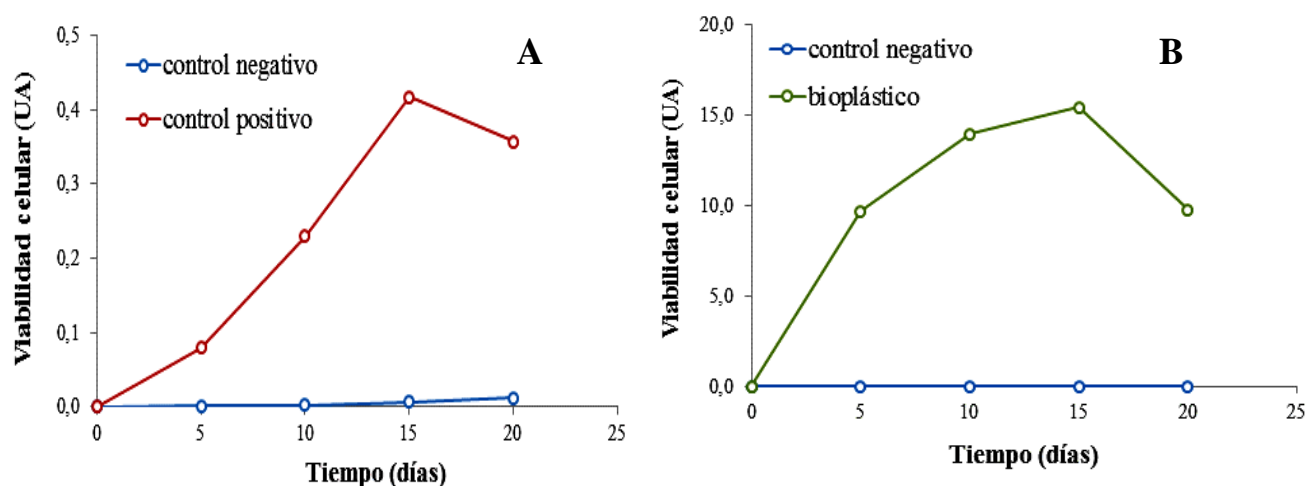


Figura 6. Ensayo de biodegradabilidad de láminas de WPC/Gli utilizando la cepa *P. aeruginosa* PAO-1. Se muestra el desarrollo de *P. aeruginosa* medido como la cantidad de formazán generado (en unidades de absorbancia) creciendo en presencia de A) Glucosa 1% (control positivo) ó B) bioplástico formulado a base de proteínas del lactosuero. Nótese en B) que los valores de viabilidad celular alcanzados superan en un orden de magnitud a los obtenidos en A).

CONCLUSIONES

En el presente trabajo, se verificó la factibilidad y pertinencia de la aplicación de una nueva metodología de *screening* basada en la reducción de sales de tetrazolio para evaluar el potencial biodegradable de materiales plásticos. Empleando un polímero formulado a base de proteínas del lactosuero y glicerol contrastado contra un plástico sintético tradicional no-biodegradable se pudo determinar el carácter biodegradable del primero y la incapacidad del segundo para ser utilizado como fuente de nutrientes por diferentes microorganismos. En la mayoría de los ensayos, los resultados obtenidos en tan sólo 24 h pusieron en evidencia el carácter biodegradable o no de estos materiales, alentando la aplicación de este nuevo método para realizar una evaluación preliminar a los estudios normalizados de

biodegradabilidad actuales, más exigentes y laboriosos.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer a la empresa Arla Food Ingredients S.A. (Buenos Aires, Argentina) por su donación de concentrado de proteínas del lactosuero y al Área Bacteriología Clínica de la Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas (Universidad Nacional de Rosario, Argentina) por facilitar los microorganismos utilizados en los ensayos de biodegradación. También queremos expresar nuestro agradecimiento a la Secretaría de Estado de Ciencia, Tecnología e Innovación de la Provincia de Santa Fe (SECTeI), al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de Argentina (CONICET), a la Universidad Nacional de Rosario (UNR) y a la Pontificia Universidad Católica Argentina (UCA, sede Rosario) por los fondos suministrados para la realización del presente trabajo.

REFERENCIAS

- ASTM D 5338 (1998). Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- ASTM D 6400 (1999). Standard specification for compostable plastics. Philadelphia, PA: American Society for Testing and Materials.
- Berridge, M.V.; Herst, P.M.; Tan, A.S. (2005). Tetrazolium dyes as tools in cell biology: new insights into their cellular reduction. *Biotechnol Annu Rev.*, 11, 127-152.
- Bourtoom, T. (2008). Edible films and coatings: characteristics and properties. *Int. Food Res. J.*, 15, 237-248.
- Cerca, N.; Martins, S.; Cerca, F.; Jefferson, K.K.; Pier, G.B.; Oliveira, R.; Azeredo, J. (2005). Comparative assessment of antibiotic susceptibility of coagulase-negative staphylococci in biofilm versus planktonic culture as assessed by bacterial enumeration or rapid XTT colorimetry. *J. Antimicrob. Chemother.*, 56, 331-336.
- Hatzinger, P.B.; Palmer, P.; Smith, R.L.; Peñarrieta, C.T.; Yoshinari, T. (2003). Applicability of tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity and viability of groundwater bacteria. *J. Microbiol. Methods*, 52, 47-58.
- Javanmard, M. (2009). Biodegradable whey protein edible films as a new biomaterials for food and drug packaging. *Iranian J. Pharm. Sci.*, 5, 129-134.
- Lorenzen, P.C.; Schrader, K. (2006). A comparative study of the gelation properties of whey protein concentrate and whey protein isolate. *Le Lait*, 86, 259-271.
- Peeters, E.; Nelis, H.J.; Coenye, T. (2008). Comparison of multiple methods for quantification of microbial biofilms grown in microtiter plates. *J. Microbiol. Methods*, 72, 157-165.
- Pérez, L.M.; Álvarez, B.L.; Codony, F.; Fittipaldi, M.; Adrados, B.; Peñuela, G.; Morató, J. (2010). A new microtiter plate screening method for evaluating the viability of aerobic respiring bacteria in high surface biofilms. *Lett. Appl. Microbiol.*; 51, 331-337.
- Ramos, O.L.; Reinas, I.; Silva, S.I.; Fernandes, J.C.; Cerqueira, M.A.; Pereira, R.N.; Vicente, A.A.; Poças, M.F.; Pintado, M.E.; Malcata, F.X. (2013). Effect of whey protein purity and glycerol content upon physical properties of edible films manufactured therefrom. *Food Hydrocol.*, 30, 110-122.
- Soazo, M.; Pérez, L.M.; Rubiolo, A.C.; Verdini, R.A. (2013). Effect of freezing on physical properties of whey protein emulsion films. *Food Hydrocol.*, 31, 256-263.